

【技術論文】

## 新規微細化フマル酸製剤の グラム陰性細菌への抗菌効果

齋田佳菜子<sup>1\*</sup>, 奥蘭 一彦<sup>2</sup>, 石橋 崇正<sup>3</sup>, 松田 茂樹<sup>4</sup>

### Antibacterial Activity of a New Microgranular Fumaric Acid Dispersion

Kanako SAITA<sup>1\*</sup>, Kazuhiko OKUZONO<sup>2</sup>,  
Takamasa ISHIBASHI<sup>3</sup> and Shigeki MATSUDA<sup>4</sup>

<sup>1</sup>*Kumamoto Industrial Research Institute, 3-11-38, Higashi-machi, Kumamoto 862-0901, Japan*

<sup>2</sup>*Daiichi Seimo Co., Ltd., 1850, Masunaga, Arao 864-8611, Japan*

<sup>3</sup>*Nishinohon Nagase Co., Ltd., 6F, Hakata Tokyo Kaijo Nichido Bldg.,  
1-3, Shimokawabata-machi, Hakata-ku, Fukuoka 812-0027, Japan*

<sup>4</sup>*Kumamoto Miso and Shoyu Industrial Cooperatives,  
11-2, Minamisentanbata-machi, Kumamoto 862-0842, Japan*

ISSN 0385-5201

防 菌 防 黴 誌
-----------

Bokin Bobai
-------------

Shinkousan Bldg., 13-38, Nishi-Hon-machi 1-chome, Nishi-ku, Osaka, 550-0005, JAPAN.

THE SOCIETY FOR ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL AGENTS, JAPAN.

【技術論文】

## 新規微細化フマル酸製剤の グラム陰性細菌への抗菌効果

齋田佳菜子<sup>1\*</sup>, 奥藪 一彦<sup>2</sup>, 石橋 崇正<sup>3</sup>, 松田 茂樹<sup>4</sup>

### Antibacterial Activity of a New Microgranular Fumaric Acid Dispersion

Kanako SAITA<sup>1\*</sup>, Kazuhiko OKUZONO<sup>2</sup>,  
Takamasa ISHIBASHI<sup>3</sup> and Shigeki MATSUDA<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Kumamoto Industrial Research Institute, 3-11-38, Higashi-machi, Kumamoto 862-0901, Japan

<sup>2</sup>Daiichi Seimo Co., Ltd., 1850, Masunaga, Arao 864-8611, Japan

<sup>3</sup>Nishinon Nagase Co., Ltd., 6F, Hakata Tokyo Kaijo Nichido Bldg.,

1-3, Shimokawabata-machi, Hakata-ku, Fukuoka 812-0027, Japan

<sup>4</sup>Kumamoto Miso and Shoyu Industrial Cooperatives,

11-2, Minamisentanbata-machi, Kumamoto 862-0842, Japan

Although fumaric acid has antibacterial activity, it has not been used for food preservation because it dissolves in water only at low concentrations. In this study, it was found that a new microgranular fumaric acid dispersion, DF-30, easily dissolved in water, whereas the standard fumaric acid was insoluble in water even after the mixture was shaken 10 times. In our in vitro study, DF-30 killed cells of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, and *Vibrio parahaemolyticus* within a few minutes. In addition, when salted cucumber inoculated with *E. coli* O157:H7 was treated with DF30 and then stored at 4°C, no viable coliforms including *E. coli* O157:H7 was detected, whereas the viable count of *E. coli* decreased only slightly after 3 days of storage without treatment with DF30. These results suggest that DF-30 can be effectively used during the washing and processing of fresh vegetables and fruits, during which heat treatment is not feasible. (Accepted 7 July 2010)

**Key words :** Organic acid (有機酸)/Fumaric acid (フマル酸)/DF30/Antibacterial activity (抗菌活性)/Fresh vegetables (野菜).

## 緒 言

世界中のカット野菜工場において、最も洗浄に用いられている殺菌剤が次亜塩素酸ナトリウムである<sup>1)</sup>。日本でも大規模調理施設衛生管理マニュアルが厚生省によって発表され、野菜・果物を非加熱で提供する場合に次亜塩素酸ナトリウム、も

しくは有機酸等の使用の記載がある。次亜塩素酸ナトリウムは優れた殺菌作用を示す反面、カット野菜への塩素臭の残存、装置類の腐食等の課題がある。一方で、有機酸による微生物制御が報告されており、中でも、フマル酸は高い抗菌効果が報告されている<sup>2,3)</sup>。フマル酸はほとんど無味・無臭で、食品添加物の酸味料・pH調整剤として認

<sup>1</sup>熊本県産業技術センター 〒862-0901 熊本市東町3-11-38 ☎096-368-2101

<sup>2</sup>第一製網㈱ 〒864-8611 荒尾市増永1850 ☎0968-62-1164

<sup>3</sup>西日本長瀬㈱ 〒812-0027 福岡市博多区下川端町1-3 博多東京海上日動ビル別館6F ☎092-272-3661

<sup>4</sup>熊本県みそ醤油工業協同組合 〒860-0842 熊本市南千反畑町11-2 ☎096-356-8200

められているが、酢酸や乳酸に比較した場合に水における溶解度が低い(0.8g/水100g, 30°C)ことが課題であった。そこで、フマル酸を8 μm以下に粉碎して水への溶解性を改善した新規微細化フマル酸製剤(DF30)を調製したところ、高い即溶性を示すとともに、大腸菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌、枯草菌に対して極めて短時間で殺菌効果を示した。また、千切りキャベツにおいては一般生菌数の減少がみられた<sup>1)</sup>。

本研究では、フマル酸と酢酸あるいはクエン酸の抗菌性を比較するとともに、DF30のグラム陰性細菌の食中毒原因菌である腸炎ビブリオ、サルモネラ、腸管出血性大腸菌 O157:H7 (以後大腸菌 O157) に対する抗菌試験について報告する。また、野菜の浅漬げが原因となった大腸菌 O157 の集団発生事例が多く報告されていることから<sup>5)</sup>、キュウリの浅漬げへの殺菌効果の有効性についての検討を行った。

## 材料及び方法

### 1. 使用菌株

使用した菌株は、*Escherichia coli* NBRC3972, *Vibrio parahaemolyticus* NBRC12711, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* NBRC 13245は独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー部門(NBRC)より購入した。*E. coli* O157:H7は、熊本県保健環境科学研究所より分与を受けた。それぞれの菌株の保存培地から、ブイオン培地に接種して、前培養を15時間程度行った。前培養した培養液を本培養用のブイオン培地に1.0%接種し、本培養を4~5時間程度行った。培養菌体は生理食塩水含有リン酸緩衝液(PBS)で3回洗浄し、PBSに懸濁して被験菌液とした。

### 2. 使用剤

DF30は第一製網株式会社製を使用した。DF30の組成は、フマル酸30.0%、グリセリン脂肪酸エステル0.5%、キサンタンガム0.2%、水69.3%である。酢酸、クエン酸、フマル酸はそれぞれ和光純薬工業株式会社製を使用した。

酢酸、クエン酸、DF30はそれぞれ滅菌水で、

0.30% (v/v) 酢酸溶液、0.30% (w/v) クエン酸溶液、1.0%DF30 (w/v) 溶液(フマル酸濃度にして0.30% (w/v))を調製した。フマル酸はスターラーで一晩攪拌して0.3% (w/v) フマル酸溶液を調製した。

## 3. 実験方法

### 3.1. フマル酸の抗菌性の比較

#### 1) フマル酸・酢酸・クエン酸の抗菌性の比較

0.3%各種有機酸溶液5.0mLに、大腸菌の被験菌液5.0mL(約 $2 \sim 6 \times 10^8$  cfu/ml)を添加し、30°Cでインキュベートをおこなった。一定時間ごと(0, 1, 2, 3, 5, 60min.)に0.1mlを採取して、PBSで適宜希釈を行い、ブイオンアガー培地に塗布した。37°C, 18時間程度培養を行った後、生育した大腸菌のコロニーの計数を行った。各希釈段階について2回の測定を行った。pH測定にはpHメータHM-60V(東亜ディーケーケー株式会社)を用いて測定を行った。

#### 2) フマル酸・酢酸・クエン酸の大腸菌O157に対する細胞内物質漏出効果の検討

調製した大腸菌 O157の菌液をV-560UV/Vis Spectrophotometer(日本分光株式会社)を用いてO.D.660nmを測定し、O.D.660nm=1.0となるようにPBSで希釈を行った。試験管に、菌液、各有機酸をそれぞれの濃度(0.0025, 0.0050, 0.0075, 0.0100%)になるよう加えて混合し、O.D.260nmおよび280nmでそれぞれ測定した<sup>6)</sup>。

### 3.2. フマル酸製剤(DF30)の抗菌性

#### 1) フマル酸とDF30の溶解性の比較

バイアル瓶にDF30をフマル酸濃度にして0.05, 0.10, 0.15% (w/v)となるように秤量して、蒸留水を添加した。バイアル瓶を上下に10回振とうして溶解状態を確認した。比較として、フマル酸を用いて同様の操作を行い、溶解状態を確認した。

#### 2) DF30の食中毒原因菌に対する抗菌効果

1.0% (w/v) DF30 5.0mLに、大腸菌 O-157, サルモネラ, 腸炎ビブリオの各被験菌液5.0mL(約 $2 \sim 6 \times 10^8$  cfu/ml程度)を接種し、30°Cでインキュベートをおこなった。一定時間ごと(0, 1, 2, 3, 5, 60min.)にサンプルを0.1 mL採取し、採取したサンプルは適宜PBSで希

積を行い、ブイオンアガー培地に塗布した。37℃、18時間程度培養を行った後、生育した菌のコロニーの計数を行った。各希釈段階について2回の測定を行った。

### 3) DF30のキュウリの浅漬けへの効果

市販キュウリをスーパーマーケットで購入し、水道水あるいは0.5% (w/v) DF30 1Lで10分間、室温で各1本ずつ浸漬して洗浄した。浸漬したキュウリはキムワイプで水気を拭き取った。クリーンベンチ内でキュウリを5mm程度にカットし、両端は除いて25gずつストマック袋に入れた。ストマック袋に大腸菌 O157 を  $1.0 \times 10^4$  cfu/g となるように接種した。漬け汁として、5.0% (w/v) NaCl 溶液、もしくは、0.5% (w/v) DF30 を含む5.0% (w/v) NaCl 溶液を前記ストマック袋に加え、4℃で3日間冷蔵保存した。0日目と3日目のサンプルをストマッキングして滅菌リン酸緩衝生理食塩水で希釈後、混積法での一般生菌数測定と Pro media アガートリコロール (エルメックス社) での大腸菌群測定を行った。SPC は35℃、48時間培養を行い、大腸菌群測定は35℃、24時間培養を行った。SPC は生育したすべての集落の計数を行った。大腸菌群測定では *E. coli* とみられる青～青紫色の集落、大腸菌 O157 を含む大腸菌群とみられる赤～赤紫色の集落、その他の腸内細菌とみられる白色の集落のそれぞれの計数を行った。各希釈段階について2回の測定を行った。

## 実験結果

### 1. フマル酸の抗菌性の比較

#### 1) フマル酸・酢酸・クエン酸の抗菌性の比較

フマル酸・酢酸・クエン酸について、大腸菌に対する抗菌試験の結果を Fig.1 に示した。大腸菌について、酢酸またはクエン酸では、0.075%、0.15%のいずれでも60分処理において初発菌数と変化せず、殺菌効果は認められなかった。フマル酸の0.075%においては、接種直後の0分では  $7.7 \times 10^6$  cfu/ml で、5分後に100cfu/ml へと菌数が大幅に減少し、60分後では菌の生育が全くみられなかった。フマル酸の0.15%においては、接

種直後の0分では  $4.6 \times 10^6$  cfu/ml で、3分後に400cfu/ml へと菌数が大幅に減少し、60分後では菌の生育が全くみられなかった。フマル酸においては、0.075%および0.15%のいずれについても、数分以内に殺菌効果が認められた。各種有機酸に比較して、フマル酸は最も抗菌性が高かった。

Fig.1 の抗菌試験を行った各有機酸について、pH 測定を行った (Fig.2)。0.15% (v/v) 酢酸が pH3.17、0.15% (w/v) クエン酸が pH2.76、0.15% (w/v) フマル酸が pH2.69 であった。フマル酸の pH は酢酸よりは低く、クエン酸より多少低かったが、ほぼ同程度であった。

#### 2) フマル酸・酢酸・クエン酸の大腸菌 O157 に対する細胞内物質漏出効果の検討

Fig.3 に大腸菌 O157 に対しての細胞内物質の漏出を検出した結果を示した。260nm においては核酸物質、280nm においてはタンパク質成分

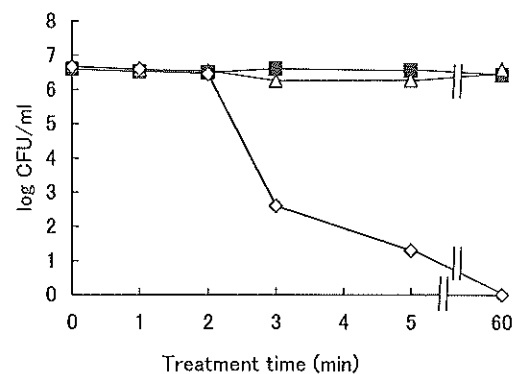
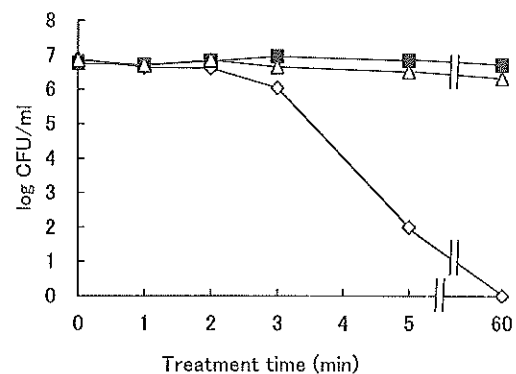


Fig.1. Viable cell count of *E. coli* after treatment of 0.075% (a) and 0.15% (b) organic acids.  $\Delta$ : acetic acid,  $\blacksquare$ : citric acid,  $\diamond$ : fumaric acid.

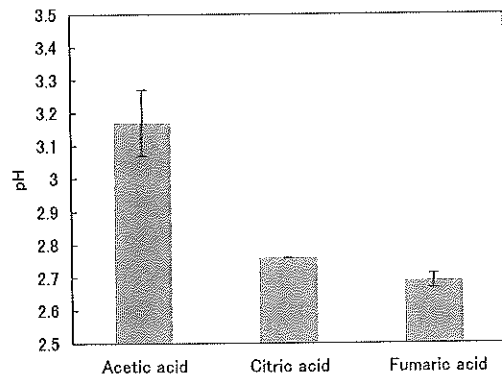


Fig.2. pH of distilled water with 0.15% (v/v) acetic acid, 0.15% (w/v) citric acid and 0.15% (w/v) fumaric acid. The vertical bars represent the standard deviation of the mean of 3 replications.

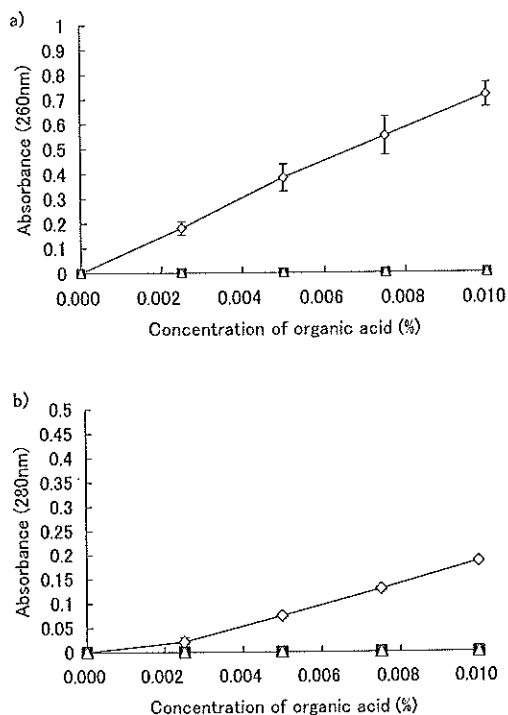


Fig.3. Release of intracellular components of *E. coli* O-157 at 260 nm (a) and 280 nm (b). △ : acetic acid, ■ : citric acid, ◇ : fumaric acid. The vertical bars represent the standard deviation of the mean of 3 replications.

と考えられる漏出が検出される。その結果、フマル酸について、260nmにおいては、0.0025%では吸光度が0.18、0.010%では0.72に達した。

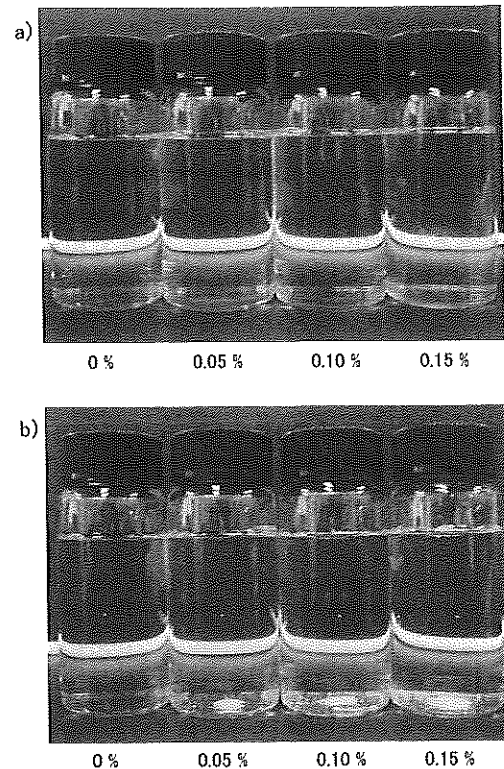


Fig.4. Solubility in distilled water of DF30 (0~0.15%) (a) and fumaric acid (0~0.15%) (b) after the mixtures were shaken 10 times.

280nmにおいては、0.0025%では吸光度が0.02、0.010%では0.19に達した。酢酸またはクエン酸においては、いずれも吸光度の変化がみられず、効果が検出されなかった。フマル酸については、濃度依存的に吸光度が上昇し、漏出物が拡大していることが最も顕著に認められた。

## 2. フマル酸製剤 (DF30) の抗菌性

### 1) DF30とフマル酸の溶解性の比較

DF30とフマル酸の溶解状態の比較を Fig.4 に示した。DF30はすべての濃度で完全に溶解したことが確認されたが、フマル酸については0.05%をはじめとして、すべての濃度で溶解残りが確認された。

### 2) DF30の食中毒原因菌に対する抗菌効果

Table 1 に、各種食中毒原因菌に対する DF30 の抗菌試験の結果を示した。Fig.1 の結果から、より即効性のあるフマル酸濃度0.15% (w/v)

Table 1. Viable cell counts (CFU/ml) of *E. coli* O-157, *S. enterica* and *V. parahaemolyticus* in broth containing DF30.

Test strain	Sample name	Time (min)					
		0	1	2	3	5	60
<i>E. coli</i> O157	0.5% (w/v) DF30	$5.8 \times 10^5$	$1.1 \times 10^4$	<10	<10	<10	<10
	Control (PBS)	$7.0 \times 10^6$	—	—	—	—	$9.9 \times 10^5$
<i>S. enterica</i>	0.5% (w/v) DF30	$8.4 \times 10^1$	<10	<10	<10	<10	<10
	Control (PBS)	$2.0 \times 10^6$	—	—	—	—	$2.2 \times 10^5$
<i>V. parahaemolyticus</i>	0.5% (w/v) DF30	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	Control (PBS)	$5.7 \times 10^6$	—	—	—	—	$4.3 \times 10^6$

— : Not tested.

Table 2. Counts (CFU/g) of mesophilic aerobic bacteria, *E. coli*, coliforms, and other enterobacteria when salted cucumber inoculated with *E. coli* O157 was treated or untreated with DF30 and kept at 4°C for 3 days.

Bacteria	NaCl soln (5.0%, w/v)		NaCl soln (5.0%, w/v) + DF30 (0.5%, w/v)	
	Day 0	Day 3	Day 0	Day 3
	Mesophiles	$6.7 \times 10^5$	$1.2 \times 10^6$	$4.5 \times 10^4$
<i>E. coli</i>	0	0	0	0
Coliforms*	$1.4 \times 10^4$	$2.2 \times 10^3$	0	0
Other enterobacteria	$1.1 \times 10^4$	$2.5 \times 10^3$	0	0

\**E. coli* O157 was included in coliforms.

(0.5% (w/v) DF30) で実験を行った。大腸菌 O157 については 2 分後で、サルモネラについては 1 分後で、腸炎ビブリオ菌については混合した直後の 0 分の各処理後で、菌の生育がみられず、それぞれ殺菌効果が認められた。

### 3) DF30 のキュウリの浅漬けへの効果

キュウリの浅漬けに大腸菌 O157 を接種し、DF30 で処理した際の大腸菌 O157 の生存と一般生菌、大腸菌群およびその他の腸内細菌への効果を Table 2 に示した。なお、大腸菌 O157 のコロニーは大腸菌群に含まれる。

キュウリを水道水に浸漬した後に塩漬けを行った無処理区については、一般生菌は 3 日目で  $1.2 \times 10^6$  CFU/g となり、0 日目 ( $6.7 \times 10^6$  CFU/g) の約 2 倍に増加した。大腸菌 O157 を含む大腸菌群は 3 日目で  $2.2 \times 10^3$  CFU/g となり、0 日目 ( $1.4 \times 10^4$  CFU/g) からの 6 割程度の減少となった。その他の腸内細菌では 3 日目で  $2.5 \times 10^3$  CFU/g となり、0 日目 ( $1.1 \times 10^4$  CFU/g) からの 4 割程度の減少となった。大腸菌 O157 を含む大腸菌群およびその他の腸内細菌のいずれにおいても、菌数は若干の減少しかみられなかった。一方、キュウリを 0.5% (w/v)

DF30 希釈液に浸漬した後に、塩漬け (0.5% (w/v) DF30 希釈液を含む) を行った処理区については、一般生菌では 0 日目の初菌数が  $4.5 \times 10^4$  CFU/g となり、無処理区 ( $6.7 \times 10^6$  CFU/g) の 1 割程度であった。さらに、3 日目には  $1.0 \times 10^4$  CFU/g となり、0 日目の 4 割程度に減少した。大腸菌 O157 を含む大腸菌群およびその他の腸内細菌のいずれについても、0 日目と 3 日目で菌が全く認められなかった。

## 考 察

酢酸またはクエン酸とフマル酸の抗菌性を比較した場合、フマル酸の抗菌性が他の有機酸よりも高いことが報告されている<sup>2,3)</sup>。本研究でも、大腸菌に対してフマル酸の高い抗菌効果が確認された。さらに、大腸菌 O157 に対して、フマル酸と他の有機酸と処理した後、細胞からの核酸物質とタンパク質の漏出を比較した。いずれについても、酢酸やクエン酸については漏出効果が見られず、フマル酸については漏出が観察された。有機酸の抗菌性は pH の低下や非解離の分子が微生物の細胞壁や細胞膜を透過して、細胞質内の pH の低下

やプロトン駆動力の破壊を招くことによるとされる<sup>7,8)</sup>。フマル酸は酢酸やクエン酸よりも非解離分子濃度が小さく、pH低下作用は大きい<sup>7)</sup>。本研究でpHを測定したところ、同濃度では、フマル酸のpHは酢酸よりも低く、クエン酸より多少低かったが、ほぼ同程度であった。このことにより、フマル酸の抗菌作用にはpH低下が多少関係していると考えられるが、本研究では、酸抵抗性が比較的強いといわれている大腸菌O157について細胞からのDNA、RNAやタンパク質の漏出が観察された。そのため、pH低下だけでフマル酸の抗菌作用を説明するのは難しい。同じく、カルボン酸を有する乳酸についてはグラム陰性細菌外膜の透過障壁機能を弱めて、透過性を上昇させる作用が認められている<sup>9)</sup>。フマル酸の抗菌メカニズムの詳細については今後の検討が必要であるが、細胞成分の漏出が認められたことから、フマル酸にも乳酸のようにグラム陰性細菌外膜の透過障壁機能を弱めて、透過性を増加させる作用があると考えられる。

こうした抗菌効果があるにも関わらず、フマル酸は水に溶解しがたい<sup>7)</sup>ことが使用の妨げとなってきた。実際、フマル酸とDF30（それぞれフマル酸濃度として、0.05、0.10、0.15% (w/v)）の溶解状態を比較したところ、フマル酸では溶け残りが認められた。フマル酸の溶解度は0.63% (25℃)であるが、実使用を想定した10回程度の振とうではフマル酸が溶解しないことが確認された。DF30は、フマル酸を微細化することによって比表面積が広がり、水和溶解しやすくなったものと考えられる。

ところで、野菜や果物に付着する細菌叢は元来、腐敗原因菌のみと考えられてきたが、野菜や果物あるいは一次加工品に食中毒原因菌が付着し、これに起因すると考えられる食中毒事件が主に米国を中心に増えている。また、野菜に食中毒原因菌を接種した場合、野菜上で生存、あるいは増殖することが報告されている<sup>9)</sup>。DF30の腸炎ビブリオ、サルモネラ、大腸菌O157に対する抗菌試験では、数分間で殺菌効果がみられた。腸炎ビブリオへの高い抗菌性については、もともと腸炎ビブリオが酸性環境では増殖が悪い<sup>10)</sup>ことが影響し

ていると考えられる。

日本では、野菜の浅漬けが原因とされる大腸菌O157の集団感染事例が多く報告されている。本研究の結果では、キュウリに大腸菌O157を接種し、DF30を含む食塩水を漬け汁として処理して浅漬けにした場合、0、3日目で*E. coli*、大腸菌群やその他の腸内細菌を全く検出しなかった。漬物の衛生規範によると、*E. coli*や腸炎ビブリオが陰性との指針が示されている。フマル酸は食品添加物として使用できることから、DF30を洗浄だけでなく、浅漬けといった食品を加工する際にも利用することができる。次亜塩素酸ナトリウムは洗浄だけでも独特の臭気が食品に残ることから、DF30を野菜などの生食する食品のグラム陰性細菌の制御に用いることは有効であると期待される。

また、キュウリの浅漬けの一般生菌については、5.0% (w/v) 食塩水に浸漬した場合には3日目に増殖がみられたが、0.5% (w/v) DF30を含む5.0% (w/v) 食塩水で処理した場合には、初発菌数の低下とともに、増殖も抑えられた。今回、キュウリの洗浄は浸漬を1回だけであったので、カット野菜工場で行われているような3~4回の洗浄を行い<sup>11)</sup>、初発の菌数を減少させることができれば、カット野菜や果物、サラダといった生食する惣菜の一般生菌の管理にも効果的に利用できると思われる。

## 結 論

フマル酸、酢酸、クエン酸の抗菌性を比較したところ、酢酸またはクエン酸については大腸菌に対する抗菌性が見られなかったが、フマル酸については数分後に菌数の大幅な減少がみられ、60分後には殺菌効果がみられた。次に、フマル酸の大腸菌O157について細胞成分の漏出効果を調べたところ、酢酸またはクエン酸については全く効果が見られなかったが、フマル酸では漏出効果が見られた。

新規微細化フマル酸製剤DF30とフマル酸それぞれに蒸留水を加えて10回振とうしたところ、DF30は溶解したことが確認された。フマル酸に

についてはすべてで溶解残りがあり、溶解し難いことが確認された。DF30は即効的な殺菌作用を有することが特徴であり、大腸菌 O157については2分後、サルモネラについては1分後、腸炎ビブリオについては添加後すぐに殺菌効果を示した。

DF30を添加したキュウリの浅漬けに大腸菌 O157を接種したところ、冷蔵保存3日目についても大腸菌 O157を含む大腸菌群が全くみられなかった。そのため、DF30を加熱殺菌ができない野菜や果物など生鮮食品の微生物制御に用いることは有効であると考えられた。

### 文 献

- 1) 中山茂幸 (2008) 食品の殺菌手法—原理・特徴・現状・課題. [6] 化学的手法. (3) 食品の次亜塩素酸ナトリウムによる殺菌, 防菌防黴, 36, (10), 697-704.
- 2) 清水高正, 高島俊弘, 加藤正博 (1995) 食品添加物として使用される数種の有機酸の抗菌作用. 食衛誌, 36, (1), 50-54.
- 3) 高本一夫 (2007) 青果物/カット野菜の衛生管理法と微生物制御技術. 9. 化学的微生物制御技術 (4) 天然系抗菌剤: 有機酸製剤. 防菌防黴, 35, (6), 395-399.
- 4) 奥菌一彦 (2008) フマル酸分散液の開発と応用, 月刊フードケミカル, 24, (5), 19-23.
- 5) 宮原美知子, 宮原 誠 (2007) 塩漬野菜の保存と電子線照射における腸管出血性大腸菌, 大腸菌群と生菌数の菌数消長について, 防菌防黴, 35, (12), 779-783.
- 6) Je, J. -Y., Kim, S. -K., (2006) Chitosan derivatives killed bacteria by disrupting the outer and inner membrane, *J. Agric. Food Chem.*, 54, 6629-6633.
- 7) 高島 明, 宮澤三雄 (2010) 食品の化学的保存技術14各論 4) その他③有機酸, 防菌防黴, 38, (5), 351-359.
- 8) Alakomi, H. -L., Skytta, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., Helander, I. M., (2000) Lactic acid permeabilizers gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 2001-2005.
- 9) 泉 秀実 (2006) 青果物/カット青果物の衛生管理法と微生物制御技術. [2] 青果物の衛生管理法. (1) 米国における GAP の現状, 防菌防黴, 34, (11), 750-755.
- 10) 小久保彌太郎編 (2007) 現場で役立つ食品微生物 Q&A, pp.47-52, 中央法規.
- 11) 泉 秀実 (2007) 青果物/カット青果物の衛生管理法と微生物制御技術. [4] カット青果物の衛生管理法. (1) 米国における HACCP と QTV の現状, 防菌防黴, 35, (1), 47-55.